

СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

© 2024 г. А. А. Яковлев^{1, 2, *}, Т. А. Дружкова¹, Н. А. Соловьева³, А. Б. Гехт¹,
Н. В. Гуляева^{1, 2}

¹Научно-практический психоневрологический центр им. З.П. Соловьева ДЗМ, Москва, Россия

²Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

³Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Научно-исследовательский институт
биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича”, Москва, Россия

*E-mail: al_yakovlev@ihna.ru

Поступила в редакцию 18.11.2022 г.

После доработки 07.12.2022 г.

Принята к публикации 08.12.2022 г.

Экстраклеточные везикулы (ЭВ) в последнее время стали важным объектом для изучения. Предполагается, что посредством ЭВ в организме осуществляется межклеточная коммуникация, в том числе регулирование экспрессии генов, управление такими процессами, как пролиферация и дифференцировка, а также многое другое. Также показана важная роль ЭВ в патологии. Важным практическим применением ЭВ считается их использование в качестве маркеров различных патологических состояний. В настоящее время понимание молекулярных механизмов действия ЭВ весьма ограничено, не в последнюю очередь в связи с методическими сложностями изучения этих объектов. В первую очередь стоит отметить, что не существует стандартизованного метода выделения ЭВ, а это является проблемой для более глубокого изучения ЭВ. Мы попытались подобрать наиболее приемлемый метод выделения ЭВ из сыворотки крови. Для этого ЭВ были выделены из сыворотки крови с помощью трех методов, после чего с помощью масс-спектрометрии определили белковый состав выделенных ЭВ. У каждого из проверенных методов нашли свои преимущества и свои недостатки, что необходимо учитывать при планировании экспериментов в дальнейшем.

Ключевые слова: экстраклеточные везикулы, сыворотка крови, анализ траектории наночастиц, динамическое светорассеяние, масс-спектрометрия

DOI: 10.31857/S1027813324030108, EDN: EРYXVE

ВВЕДЕНИЕ

Экстраклеточные везикулы (ЭВ) представлены во всех биологических жидкостях и являются довольно большой гетерогенной группой. Фактически, любые окруженные липидным бислоем везикулы, не способные к самовоспроизведению и циркулирующие в биологических жидкостях, можно назвать ЭВ [1]. Все исследованные к настоящему времени типы клеток способны к секреции ЭВ. ЭВ принято подразделять на экзосомы, микровезикулы и апоптотические тельца. Экзосомы являются продуктом секреции клеточной эндолізосомальной системы и имеют размер 50–150 нм. Микровезикулы являются результатом отщуривания плазматической мембраны клетки, их размер составляет 100–1000 нм. Самым большим

по размеру (400–4000 нм) представителем ЭВ являются апоптотические тельца, образующиеся из клеток как результат их гибели в процессе апоптоза. Также ЭВ часто классифицируют по размеру, малыми ЭВ называются все ЭВ менее 200 нм [1].

ЭВ за последние годы стали востребованным объектом экспериментальных исследований. Популярность ЭВ связана с их несколькими уникальными свойствами. Во-первых, мембрана ЭВ содержит сигнал, предохраняющий ЭВ от фагоцитирования макрофагами [2]. Во-вторых, свойства ЭВ позволяют им проникать через гистогематические барьеры, включая гематоэнцефалический [3]. В-третьих, любые клетки поглощают ЭВ [4]. Все эти свойства очень способствуют тому, чтобы развить диагностику на основе ЭВ или даже

использовать ЭВ в качестве средства доставки лекарственных препаратов.

В настоящее время не существует стандартизованного метода выделения ЭВ, что, безусловно, является препятствием для дальнейшего развития этого направления. Для выделения ЭВ в основном используются ультрацентрифугирование, ультрафильтрация, гель-фильтрация, преципитация и иммунопреципитация, а также комбинации этих методов. Несколько работ посвящены сравнению существующих методов выделения ЭВ, и они не приходят к единому выводу об эффективности того или иного подхода [5–7]. Как правило, разные методы выделения ЭВ приводят к выделению разных субфракций ЭВ, которые отличаются между собой по составу.

Обычно для выделения ЭВ используют ультрацентрифугирование, гель-фильтрацию, преципитацию полимерами, ультрафильтрацию или иммунопреципитацию. Долгое время золотым стандартом считалось выделение ЭВ с помощью ультрацентрифугирования, но сейчас для выделения ЭВ применяют и другие методы. Гель-фильтрация и преципитация гидрофильными полимерами являются подходящей альтернативой ультрацентрифугированию, отличающейся целым рядом преимуществ. Эти методы обходятся недорого, легко масштабируемы и обладают высокой производительностью.

В настоящее время остается непонятным, какой метод, а точнее, какую комбинацию методов, лучше всего использовать при выделении ЭВ для целей протеомного анализа. Для того, чтобы это выяснить, для выделения ЭВ мы использовали комбинацию гель-фильтрации через Sepharose CL-2B, преципитации с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ) 6000, обработки протеазами и ультрафильтрации через мембрану с порогом отсека 100 кДа, после чего определяли белковый состав полученных фракций с помощью масс-спектрометрии.

МЕТОДЫ

Реактивы и материалы. В работе были использованы ПЭГ 6000 (A1387, AppliChem, Германия), фосфатно-солевой буфер PBS (14190-094, Gibco, Великобритания), фильтры 0.45 мкм и фильтры 100 кДа (MCPM45C67, MCP100C41, Pall, Пуэрто-Рико), протеиназа К (EK001, Evrogen, Россия), смола для гель-фильтрации Sepharose CL-2B (17014001, Cytiva, США), набор для определения концентрации белка ProteOrange (14102, Lumiprobe, Россия), бычий сывороточный альбумин (BCA, 126609, Calbiochem, США).

Критерии отбора клинического материала. В исследование были включены 8 здоровых добровольцев в возрасте от 18 до 45 лет. От каждого

добровольца было получено письменное информированное согласие. Критериями исключения являлись шизофрения; алкоголизм и наркомания в анамнезе жизни; серьезные неврологические заболевания (инсульт, болезнь Паркинсона, деменция, ушибы мозга, эпилепсия и т.п.); эндокринные нарушения: сахарный диабет, дисфункция щитовидной железы и прием тиреотропных препаратов/заместительной терапии; любое инвалидизирующее заболевание внутренних органов; выраженный дефицит зрения или слуха; значительные физические нагрузки накануне обследования, суточный и ночной графики работы, прием антикоагулянтов и психотропных препаратов в период перед участием в исследовании. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом.

Материал для исследования. Материалом для исследования служила сыворотка крови. Забор крови у участников исследования проводили из локтевой вены натошак в утренние часы. Известно, что на образование ЭВ оказывает влияние множество факторов, так что процедура взятия крови и преаналитический этап подготовки проб были максимально стандартизованы. Для всех проб были соблюдены одинаковые условия, а именно: время и способ забора крови, тип моновет и размер иглы (21,5G); промежуток времени (не более 30 минут) и температура в помещении между взятием крови и центрифугированием (22–23°C); условия центрифугирования; условия хранения биологического материала на всех этапах анализа.

Выделение грубой фракции ЭВ с помощью ПЭГ. Исходный объем образцов составлял 1 мл сыворотки крови. Предварительную очистку образцов проводили с помощью центрифугирования через фильтр 0.45 мкм. Центрифугирование проводили 30 мин 3 000 g при RT. После этого получали грубую фракцию ЭВ с помощью преципитации. Предварительно очищенную сыворотку смешивали 1 к 1 с 6% ПЭГ 6000, тщательно перемешивали и оставляли на 30 мин при 4°C. Затем образцы центрифугировали 1 500 g 30 мин при 4°C. С осадка тщательно отбирали надосадочную жидкость и промывали осадок с помощью PBS. Осадок растворяли в 0.5 мл PBS, это грубая фракция ЭВ.

Обработка грубой фракции ЭВ протеиназой К. Расщепление примесных белков, а также наружных белков ЭВ проводили с помощью протеиназы К (ПК). Концентрация ПК составляла 1 мг/мл, концентрация хлорида кальция 10 mM, время обработки 60 мин, температура обработки 37°C.

Выделение чистой фракции ЭВ с помощью гель-фильтрации. Гель-фильтрацию проводили на колонке, набитой 10 мл Sepharose CL-2B. На колонку наносили 0.5 мл образца, промывали 3 мл PBS и элюировали ЭВ в 1 мл PBS. Перед следующей пробой колонку промывали 15 мл PBS.

Ультрафильтрация. Концентрирование проводили на фильтрах с порогом отсека 100 кДа. Образцы центрифугировали 30 мин при 3 000 g при RT. Образцы были сконцентрированы примерно в 10 раз.

Определение концентрации белка. Концентрацию белка определяли с помощью красителя ProteOrange согласно инструкции производителя. По 1 мкл пробы смешивали с 40 мкл рабочего раствора красителя и прогревали 10 мин при 95°C, после чего пробы охлаждали до комнатной температуры и определяли флуоресценцию при длинах волн возбуждения и испускания 470 и 570 нм, соответственно. Калибровочную кривую строили по растворам БСА.

Динамическое светорассеяние. Динамическое светорассеяние фракции ЭВ определяли с помощью прибора Zetasizer Nano S производства Malvern Panalytical (Великобритания). В пластиковую кювету наливали 100 мкл разведенной в 10 раз в PBS фракции ЭВ и определяли светорассеяние на угол 173 градуса на длине волны 633 нм за четыре повтора длительностью по 10 с каждый. Оборудование позволяет определить число отраженных фотонов, выражаемое в тысячах фотонов в секунду, kcps. Общее число отраженных фотонов используется для построения корреляционной функции для вычисления размера частиц, но может служить и самостоятельным параметром, характеризующим образец. В нашей предыдущей работе мы показали, что число фотонов является вполне надежным показателем, характеризующим число ЭВ в образце.

Анализ траектории наночастиц. Анализ траекторий наночастиц проводили на приборе NanoSight NS300 производства Malvern Panalytical (Великобритания). В качестве источника света в нем используется лазер с длиной волны 488 нм. Свет от лазера входит в проточную кювету, содержащую образец, и рассеивается на объектах размером 50–500 нм. Под углом около 90 градусов к направлению света находится объектив микроскопа, через который все рассеивающие свет частицы снимают на камеру с частотой 25 кадров в секунду. Последующая компьютерная обработка отснятого видео позволяет проследить траекторию движения каждой частицы индивидуально и, используя уравнение Стокса-Эйнштейна из величины перемещения за единицу времени, вычислить размер частицы. Образец постоянно подавали в проточную кювету с помощью шприцевого насоса, что позволяет записать на видео движение большого числа индивидуальных ЭВ. Прибор поддерживает постоянную температуру во время эксперимента. Выделенные ЭВ разводили в PBS в 100 раз и снимали два видео продолжительностью 30 сек каждое, результаты для каждого образца получали усреднением результатов обработки двух видеороликов. При таком разведении в каждом кадре оказывается около

ста индивидуальных частиц. Скорость прокачки образца насосом составляла 60 у.е., так что суммарное число треков на каждом видео составляло около двух тысяч. При компьютерной обработке видео были использованы настройки постобработки, одинаковые для всех образцов, для типичных ЭВ это Blur 5×5, Max jump 12, Min track steps 5.

Пробоподготовка. Экзосомы объемом 50–100 мкл лизировали в двукратном объеме буфера, содержащего 10% SDS в 50 мМ бикарбонате триэтиламония (TEAB). Лизис проводили ультразвуковым шупом на льду 3 раза по 30 сек. Образцы центрифугировали со скоростью 13000 g 10 мин, для осаждения пены SDS.

Для гидролиза белков трипсином с использованием фильтров S-Trap забирали весь доступный объем для образцов. Для восстановления и алкилирования дисульфидных связей образцы инкубировали в присутствии 4 мМ трис(2-карбоксиэтил) фосфина (TCEP) и 6.2 мМ 2-хлорацетамида (CAA) при температуре 80°C в течение 30 мин. Затем образцы охлаждали до комнатной температуры. Добавляли 12% H_3PO_4 в соотношении 1:10 и пипетировали. Добавляли 6 частей S-Trap protein binding buffer (90% водный метанол, содержащий 100 мМ TEAB pH 7.5), хорошо перемешивали и наносили на фильтр S-Trap. После чего центрифугировали в течение 4 мин при 4000 g (повторяли до полного нанесения образца). Промывку осуществляли тем же раствором (S-Trap protein binding buffer) 4 раза, нанося по 150 мкл и центрифугируя в течение 4 мин при 4000 g. Перемещали фильтр в чистую пробирку. Добавляли 40 мкл буфера для гидролиза (трипсин/белок в соотношении 1/25, 50 мМ TEAB). Образцы инкубировали в течение 1.5 ч при температуре 47°C. После инкубации добавляли 40 мкл 50 мМ TEAB и 0.2% муравьиной кислоты, центрифугировали в течение 4 мин при 4000 g. Добавляли 35 мкл 50% ацетонитрила, содержащего 0.2% муравьиной кислоты, и центрифугировали в течение 4 мин при 4000g. Надосадочную жидкость переносили в чистую пробирку.

В полученных супернатантах определяли общую концентрацию пептидов методом колориметрического анализа с использованием набора PierceTM Quantitative Colorimetric Peptide Assay kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) в соответствии с рекомендациями производителя. Пептиды высушивали и растворяли в 0.1% муравьиной кислоте до конечной концентрации 0.3 мкг/мкл.

Хромато-масс-спектрометрия образцов. Полученные пептиды разделяли с использованием хроматографической ВЭЖХ системы Ultimate 3000 RSLCnano ("Thermo Scientific", США). Один микролитр пептидной смеси загружали на обогащающую колонку Acclaim μ -Precolumn (0,5 мм × 3 мм, размер частиц 5 мкм, Thermo Scientific) при потоке 10 мкл/мин в течение 4 мин в изографическом

режиме с использованием буфера “С” в качестве подвижной фазы (2% ацетонитрил, 0.1% муравьиной кислоты в деионизованной воде) на ВЭЖХ колонке PeakEfficiency (FE 100 мкм × 30 см, 1.9 мкм размер частиц) (Molecta) в градиентном режиме элюирования. Градиент формировали подвижной фазой А (0.1% муравьиной кислоты) и подвижной фазой Б: (80% ацетонитрил, 0.1% водный раствор муравьиная кислота) при скорости потока 0.3 мкл/мин. Колонку промывали 2% подвижной фазой Б в течение 10 мин, после чего линейно увеличивали концентрацию подвижной фазы Б до 35% за 68 мин, затем линейно увеличивали концентрацию фазы Б до 99% за 2 мин, после 2 минутной промывки при 99% буфера Б, концентрацию этого буфера линейно снижали до исходных 2% за 3 мин. Общая длительность анализа составляла 90 мин.

Масс-спектрометрический анализ проводили на масс-спектрометре Q-Exactive HFX (“Thermo Scientific”, США), как описано ранее [8]. Идентификацию белков проводили при помощи программного обеспечения MaxQuant v. 2.0.3.0 с использованием поискового алгоритма Andromeda [9]. Для идентификации белков использовали базу данных протеома человека в UniProt (UP000005640). Были заданы следующие поисковые параметры: расщепляющий фермент – трипсин, точность определения масс моноизотопных пептидов ± 4.5 ppm, точность определения масс в спектрах MS/MS ± 20 ppm и возможность пропуска двух сайтов расщепления трипсином. Окисление метионинов, ацетилирование N-конца белка и карбамидометилирование цистеина были учтены как возможные и обязательная модификация пептидов, соответственно. При идентификации белков внутри каждой экспериментальной группы выделения экзосом применяли опцию “match between runs” с установками по умолчанию. Для валидации сопоставлений (образования пар) спектров и пептидов PSM (Peptide-Spectrum Matches), идентификации пептидов и идентификации белков устанавливали пороговую величину FDR (False Discovery Rate) 0.01. Белки рассматривались в качестве достоверно идентифицированных, если для них было обнаружено, по крайней мере, два пептида. Безметковая количественная оценка содержания белков происходила на основе iBAQ и LFQ.

Статистический анализ и представление результатов. Статистическую обработку результатов проводили в программе GraphPad Prism ver. 12. Графическое представление результатов масс-спектрометрического анализа создано с помощью программы FunRich ver. 3.1.3. Для сравнения групп использовали дисперсионный анализ или тест Хи-квадрат, множественное сравнение корректировали с помощью поправки Бонферрони. В качестве апостериорного

теста использовали тест Манна-Уитни. Достоверным считали уровень значимости меньше 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Самым простым и доступным методом выделения ЭВ является, видимо, преципитация ПЭГ. К достоинствам этого метода также относится высокая производительность метода. Недостаток преципитации с помощью ПЭГ также очевиден – высокая доля примесных белков во фракции ЭВ. Гель-фильтрация позволяет избавиться от некоторой части примесных белков, но при этом является довольно трудозатратной и трудно масштабируемой процедурой. Основную задачу по избавлению от примесей призвана выполнить обработка ЭВ протеазами, в частности ПК. Последовательность этих методов была применена нами для выделения ЭВ с целью отработки наиболее пригодного метода выделения ЭВ, в первую очередь характеризующегося минимальным наличием примесных неэкзосомальных белков.

Основные характеристики ЭВ, выделенных с помощью разных методов, представлены в таблице 1. В общем, мы вправе заключить, что полученные результаты являются вполне ожидаемыми. Преципитация ПЭГ ожидаемо позволяет выделить максимальное число частиц с самой высокой концентрацией белка. Гель-фильтрация значительно снижает как число частиц, так и количество белка в них ($p < 0.05$ по тесту Манна-Уитни). Обработка ПК на общее число частиц не влияет, но достоверно снижает количество белка ($p < 0.05$ по тесту Манна-Уитни).

Другой важнейшей характеристикой ЭВ является размер частиц. Используемые методы позволяют предполагать, что после преципитации мы будем иметь частицы размером до примерно 200 нм, а после гель-фильтрации частицы не меньше примерно 70 нм. Полученные нами ЭВ попадают в ожидаемые диапазоны размеров частиц (табл. 1). Однако, два метода оценки размеров частиц дают плохую согласованность результатов для ЭВ, полученных преципитацией ПЭГ. Возможно, это наблюдение является следствием большого количества примесей в этой фракции. Примеси, вероятнее всего белки, за счет взаимодействия с везикулами могут замедлять их движение в кювете прибора. А такое не связанное с размером замедление движения частиц в растворе алгоритм обработки данных трактует как увеличение размеров частиц. Для более чистых фракций результаты определения размеров частиц неплохо совпадают для двух использованных методов (табл. 1).

При анализе данных ДРС и АТН нами вновь был подмечено наличие высокодостоверной корреляции между числом частиц (АТН) и числом рассеянных фотонов (ДРС) (данные не представлены).

Таблица 1. Основные характеристики ЭВ, выделенных с использованием разных методов.

Группа	Число частиц в мл, $\times 10^6 \times 10^3$	Размер частиц, нм (ДРС)	Размер частиц, нм (АТН)	Количество белка, мкг (ЭВ из 1 мл сыворотки)
Преципитация ПЭГ	16.0 $\pm$ 4.4	138.7 $\pm$ 42.4	184.9 $\pm$ 11.2	108.2 $\pm$ 10.9
Гель-фильтрация после преципитации ПЭГ	4.1 $\pm$ 1.4	120.4 $\pm$ 18.6	134.8 $\pm$ 6.3	17.5 $\pm$ 10.1
Гель-фильтрация после преципитации ПЭГ и обработки ПК	6.4 $\pm$ 2.1	128.4 $\pm$ 9.5	129.1 $\pm$ 3.0	3.2 $\pm$ 1.6

Таким образом, мы воспроизвели результаты одного из своих прошлых экспериментов [10], позволившие нам утверждать, что с помощью метода ДРС можно быстро и достаточно надежно определять концентрацию ЭВ в достаточно чистых образцах. Естественно, сказанное не относится к образцам исходной сыворотки, как, вероятно, и других биологических жидкостей сложного состава, так как высокая концентрация примесей практически наверняка будет мешать определению истинной концентрации ЭВ. В своих экспериментах, даже при минимальной очистке ЭВ с помощью ПЭГ, мы с хорошей точностью определяем концентрацию ЭВ по числу рассеянных фотонов на ДРС.

Основной задачей проведенного эксперимента было определение белкового состава полученных разными методами ЭВ. Во фракциях, как и следовало ожидать, было идентифицировано несколько сотен белковых молекул. Полный состав фракций представлен в приложении (таблицы S1–S3). Число генов, продукты которых представлены во фракциях ЭВ, полученных разными методами, представлено на рис. 1. Обращает на себя внимание тот факт, что после обработки ЭВ с помощью ПК и последующей гель-фильтрации, число белков,

идентифицированных в этой фракции с помощью масс-спектрометрии, уменьшилось практически вдвое. Возможно, обработка ПК не столь безобидна, как могло казаться ранее, и в этом процессе происходит некоторое разрушение конститутивных белков ЭВ. Однако более вероятна иная трактовка, а именно, ПК расщепляет примесные белки во фракции ЭВ.

Основной интерес представляет собой качественный состав белков, выделенных в составе ЭВ разными методами. Представление качественного разнообразия белков представляет собой определенную проблему, так как белки принимают участие во многих взаимодействиях и редко соотносятся только с одним процессом. Локализация белков является более точной характеристикой разнообразия белков, хотя, конечно, и неполной. Именно локализацию мы выбрали в качестве характеристики полученного нами разнообразия белков. На рис. 2 представлен процент генов, идентифицированные продукты которых имеют, согласно базе данных FunRich, локализацию либо в экзосомах, либо в экстраклеточных компартментах, либо принадлежат к экстраклеточным белкам. Понятно, что один и тот же белок может входить в каждую категорию, так что суммарный процент может превышать 100%. При этом только для этих трех локализаций происходит достоверное обогащение белков во фракции ЭВ, выделенных всеми тремя методами. То есть выделяя ЭВ мы обогащаем белки только из этих трех фракций и никаких иных, фактически мы видим, что каждый из этих методов пригоден для выделения ЭВ. Конкретно с фракцией экзосом связано 60–70% выделенных нами белков. Существенная часть белков, непосредственно не связанных с экзосомами, принадлежит тем не менее либо к другим экстраклеточным компартментам, либо является растворимыми экстраклеточными белками. Экстраклеточные компартменты включают в себя, например, и незэкзосомальные везикулы, такие как микрочастицы, а растворимые экстраклеточные белки могут выделяться вместе с ЭВ, так как, например, образуют околосекреторную белковую корону. Таким

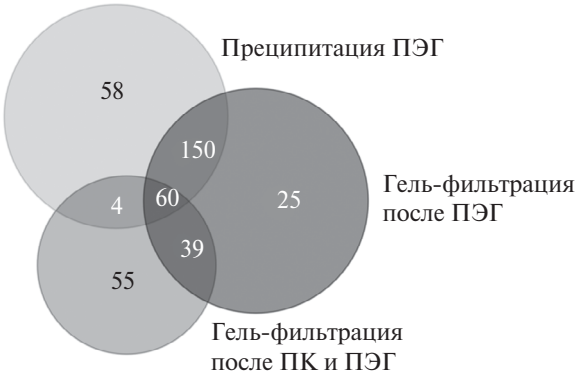


Рис. 1. Анализ протеома ЭВ, выделенных разными методами. Число белков, идентифицированных с помощью масс-спектрометрического анализа, представлено на диаграмме Венна.

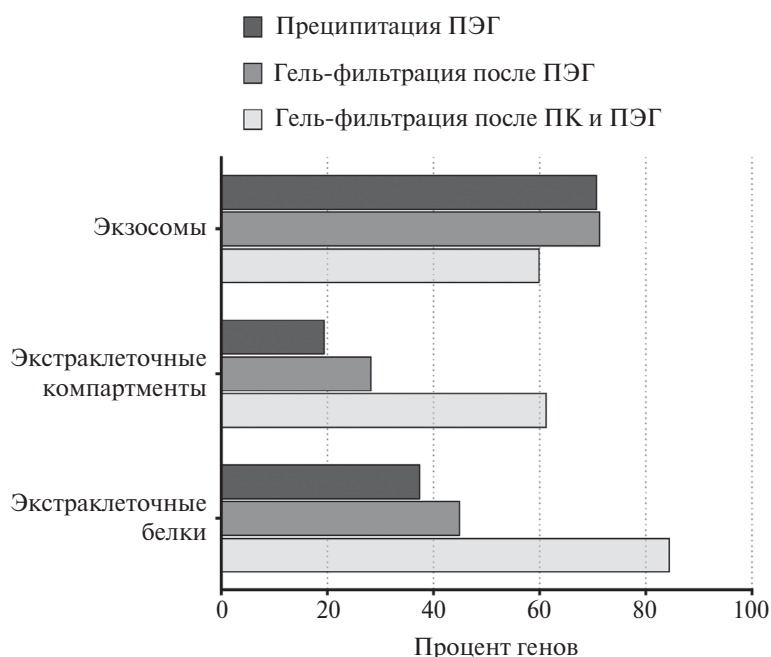


Рис. 2. Локализация белков, выявленных во фракции ЭВ, согласно базе данных FunRich. Показаны только те компартменты, белки которых достоверно обогащаются при выделении ЭВ. Во всех представленных компартментах для всех способов выделения происходит достоверное обогащение белков с достоверностью $p < 0.001$ по тесту Хи-квадрат с поправкой Бонферрони на множественные сравнения.

образом, и не истинно экзосомальные белки также могут быть частью фракции ЭВ.

С использованием трех методов выделения ЭВ были получены фракции, несколько различающиеся по белковому составу. Однако за единичными исключениями все выделенные белки, а это продукты 272 генов при выделении с помощью ПЭГ, 274 генов при выделении с помощью ПЭГ и гель-фильтрации и 158 генов при выделении с помощью ПЭГ, обработки ПК и гель-фильтрации, принадлежат к белкам ЭВ согласно базе данных Vesiclepedia.

Еще одним результатом работы оказалось, что при любом методе выделения ЭВ не удастся полностью избавиться от липопротеинов. В частности, среди тех белков, которые выделяются всеми из использованных методов (таких белков 60), выявляются альбумин, трансферрин, аполипопротеины В, Е, А1 и С. Для объяснения этого результата, видимо, стоит опираться на последние данные, убедительно свидетельствующие о том, что ЭВ, находясь в сыворотке, всегда увенчаны белковой короной [11]. Аполипопротеины, альбумин, трансферрин, судя по всему, как раз и являются неотъемлемой частью этой короны [12, 13]. Таким образом, стоит заключить, что ЭВ нельзя очистить от целого ряда белков, не являющихся истинно везикулярными, по крайней мере, если применять только методы, сохраняющие белки в нативном состоянии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Все использованные нами методы выделения ЭВ пригодны для применения в тех или иных целях. Грубая преципитация с помощью ПЭГ имеет высокую производительность и подходит для изучения ЭВ в широком диапазоне размеров, от нескольких десятков до сотен нм. В эту фракцию входят, видимо, и частицы размером менее 50 нм, то есть не обязательно экзосомы и не микровезикулы. Возможно, именно эта фракция окажется информативной для решения той или иной научной задачи. Применение гель-фильтрации после преципитации существенно снижает число частиц (за счет наиболее мелких, до примерно 70 нм) и в еще большей степени количество белка во фракции ЭВ. Видимо, этот метод выделяет ЭВ вместе с нековалентно связанными белками и вероятно подходит для изучения взаимодействия ЭВ с клетками-реципиентами, так как такие ЭВ содержат на мембране весь спектр белков, присутствующих на ЭВ в сыворотке (или иной исходной биологической жидкости). Дополнительная обработка ПК драматически снижает общее число белков и их концентрацию во фракции ЭВ. Такой метод подойдет для исследования собственно ЭВ, без подавляющего большинства белков, ассоциированных с ЭВ в исходном образце.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность компании КДСО за предоставленную возможность использования приборной базы компании и лично сотрудникам КДСО С.Л. Васину и Е.О. Дуплякину за помощь в разработке оптических методов детекции ЭВ. Авторы также благодарят ЦКП “Протеом человека” ИБМХ, на базе которого был проведен протеомный анализ.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21-75-20112).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Thery C., Witwer K.W., Aikawa E., Alcaraz M.J., Anderson J.D., Andriantsitohaina R., Antoniou A., Arab T., Archer F., Atkin-Smith G.K., et al. // *J. Extracell. Vesicles*. 2018. V. 7. № 1.
2. Belhadj Z., He B., Deng H.L., Song S.Y., Zhang H., Wang X.Q., Dai W.B., Zhang Q. // *J. Extracell. Vesicles*. 2020. V. 9. № 1.
3. Khaspekov L.G., Yakovlev A.A. // *Neurochem. J.* 2023. V. 39. № 1. P. 1–18.
4. van Niel G., Carter D.R.F., Clayton A., Lambert D.W., Raposo G., Vader P. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2022. V. 23. № 5. P. 369–382.
5. Brennan K., Martin K., FitzGerald S.P., O’Sullivan J., Wu Y., Blanco A., Richardson C., Mc Gee M.M. // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1.
6. Dong L., Zieren R.C., Horie K., Kim C.-J., Mallick E., Jing Y., Feng M., Kuczler M.D., Green J., Amend S.R., Pienta K.J., Xue W. // *J. Extracell. Vesicles*. 2020. V. 10. № 2.
7. Visan K.S., Lobb R.J., Ham S., Lima L.G., Palma C., Edna C.P.Z., Wu L.-Y., Gowda H., Datta K.K., Hartel G., Salomon C., Möller A. // *J. Extracell. Vesicles*. 2022. V. 11. № 9.
8. Novikova S., Shushkova N., Farafonova T., Tikhonova O., Kamyshinsky R., Zgoda V. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 18. P. 1–29.
9. Tyanova S., Temu T., Cox J. // *Nat. Protoc.* 2016. V. 11. № 12. P. 2301–2319.
10. Yakovlev A.A., Druzhkova T.A., Nikolaev R.V., Kuznetsova V.E., Gruzdev S.K., Guekht A.B., Gulyaeva N.V. // *Neurochem. J.* 2019. V. 13. № 4. P. 385–390.
11. Yerneni S.S., Solomon T., Smith J., Campbell P.G. // *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 2022. V. 1866. № 2.
12. Tóth E., Turiák L., Visnovitz T., Cserép C., Mázló A., Sódar B.W., Försönits A.I., Petővári G., Sebestyén A., Komlósi Z., Drahos L., Kittel Á., Nagy G., Bácsi A., Dénes Á., Gho Y.S., Szabó-Taylor K., Buzás E.I. // *J. Extracell. Vesicles*. 2021. V. 10. № 11.
13. Wolf M., Poupardin R.W., Ebner-Peking P., Andrade A.C., Blöchl C., Obermayer A., Gomes F.G., Vari B., Maeding N., Eminger E., Binder H.M., Raninger A.M., Hochmann S., Bracht G., Spittler A., Heuser T., Ofir R., Huber C.G., Aberman Z., Schallmoser K., Volk H.D., Strunk D. // *J. Extracell. Vesicles*. 2022. V. 11. № 4.

Comparison of Methods for Isolation of Extracellular Vesicles from Human Serum

A. A. Yakovlev^{1, 2}, T. A. Druzhkova¹, N. A. Solovyeva³, A. B. Guekht¹, and N. V. Gulyaeva^{1, 2}

¹Scientific and Practical Psychoneurological Center named after Z.P. Solovyov DZM, Moscow, Russia

²Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

Extracellular vesicles (EVs) have recently become an important object of study. It is assumed that through EVs in the body, intercellular communication is carried out, including the regulation of gene expression, the control of proliferation and differentiation, and much more. The important role of EV in pathology is also shown. An important practical application of EVs is their use as markers of various pathological conditions. At present, the understanding of the molecular mechanisms of action of EVs is very limited, not least due to the methodological difficulties of studying these objects. First of all, it should be noted that there is no standardized method for isolating EVs, and this is a problem for a deeper study of EVs. We tried to choose the most appropriate method for isolating EVs from blood serum. For this, EVs were isolated from blood serum using three methods, after which the protein composition of the isolated EVs was determined using mass spectrometry. Each of the methods used has its own advantages and disadvantages, which must be taken into account when planning experiments in the future.

Keywords: extracellular vesicles, blood serum, nanoparticle tracking analysis, dynamic light scattering, mass spectrometry